

APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PW 279062
(M#)

Invention: NEW NUCLEOTIDE SEQUENCES ENCODING THE citA GENE

Inventor (s): Bettina MOCKEL
Mike FARWICK
Thomas HERMANN
Achim MARX
Walter PFEFFERLE

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group
1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Attorneys
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
- ☒ Regular Utility Application
- ☐ Continuing Application
 - ☒ The contents of the parent are incorporated by reference
- ☐ PCT National Phase Application
- ☐ Design Application
- ☐ Reissue Application
- ☐ Plant Application
- ☐ Substitute Specification
 - Sub. Spec Filed _____
 - in App. No. _____ / _____
- ☐ Marked up Specification re
 - Sub. Spec. filed _____
 - In App. No _____ / _____

SPECIFICATION

Neue für das citA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das citA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des citA-Gens. Das citA-Gen kodiert für die Sensor Kinase Cit A eines Zwei-Komponentensystems.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der grossen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Massnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Massnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das
- 15 citA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 20 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 25 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

30 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität Sensor Kinase Cita aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen
- 10 hybridisiert, und gegebenenfalls

- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

- eine replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1
- 15 dargestellt;

- ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

- ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemässen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz
- 20

- und coryneforme Bakterien, in denen das citA-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
- 30 einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemässen

Polynukleotids oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide enthaltend die Sequenzen gemäss der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das CitA-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des citA-Gens aufweisen.

Polynukleotide enthaltend die Sequenzen gemäss der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das CitA-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäss Erfindung schliessen ein Polynukleotid gemäss SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70 %, bevorzugt zu wenigstens 80 % und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % identisch sind mit dem Polynukleotid gemäss SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

000169 BT / T

1. The first part of the document is a list of references. The references are listed in a standard format, with the author's name, the title of the work, and the publisher. The references are as follows:

1. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **32**, 468 (1928).
2. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **33**, 470 (1929).
3. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **34**, 480 (1930).
4. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **35**, 490 (1931).
5. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **36**, 500 (1932).
6. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **37**, 510 (1933).
7. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **38**, 520 (1934).
8. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **39**, 530 (1935).
9. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **40**, 540 (1936).
10. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **41**, 550 (1937).
11. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **42**, 560 (1938).
12. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **43**, 570 (1939).
13. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **44**, 580 (1940).
14. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **45**, 590 (1941).
15. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **46**, 600 (1942).
16. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **47**, 610 (1943).
17. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **48**, 620 (1944).
18. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **49**, 630 (1945).
19. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **50**, 640 (1946).
20. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **51**, 650 (1947).
21. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **52**, 660 (1948).
22. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **53**, 670 (1949).
23. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **54**, 680 (1950).
24. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **55**, 690 (1951).
25. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **56**, 700 (1952).
26. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **57**, 710 (1953).
27. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **58**, 720 (1954).
28. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **59**, 730 (1955).
29. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **60**, 740 (1956).
30. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **61**, 750 (1957).
31. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **62**, 760 (1958).
32. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **63**, 770 (1959).
33. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **64**, 780 (1960).
34. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **65**, 790 (1961).
35. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **66**, 800 (1962).
36. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **67**, 810 (1963).
37. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **68**, 820 (1964).
38. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **69**, 830 (1965).
39. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **70**, 840 (1966).
40. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **71**, 850 (1967).
41. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **72**, 860 (1968).
42. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **73**, 870 (1969).
43. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **74**, 880 (1970).
44. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **75**, 890 (1971).
45. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **76**, 900 (1972).
46. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **77**, 910 (1973).
47. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **78**, 920 (1974).
48. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **79**, 930 (1975).
49. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **80**, 940 (1976).
50. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **81**, 950 (1977).
51. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **82**, 960 (1978).
52. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **83**, 970 (1979).
53. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **84**, 980 (1980).
54. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **85**, 990 (1981).
55. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **86**, 1000 (1982).
56. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **87**, 1010 (1983).
57. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **88**, 1020 (1984).
58. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **89**, 1030 (1985).
59. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **90**, 1040 (1986).
60. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **91**, 1050 (1987).
61. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **92**, 1060 (1988).
62. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **93**, 1070 (1989).
63. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **94**, 1080 (1990).
64. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **95**, 1090 (1991).
65. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **96**, 1100 (1992).
66. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **97**, 1110 (1993).
67. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **98**, 1120 (1994).
68. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **99**, 1130 (1995).
69. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **100**, 1140 (1996).
70. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **101**, 1150 (1997).
71. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **102**, 1160 (1998).
72. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **103**, 1170 (1999).
73. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **104**, 1180 (2000).
74. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **105**, 1190 (2001).
75. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **106**, 1200 (2002).
76. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **107**, 1210 (2003).
77. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **108**, 1220 (2004).
78. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **109**, 1230 (2005).
79. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **110**, 1240 (2006).
80. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **111**, 1250 (2007).
81. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **112**, 1260 (2008).
82. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **113**, 1270 (2009).
83. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **114**, 1280 (2010).
84. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **115**, 1290 (2011).
85. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **116**, 1300 (2012).
86. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **117**, 1310 (2013).
87. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **118**, 1320 (2014).
88. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **119**, 1330 (2015).
89. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **120**, 1340 (2016).
90. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **121**, 1350 (2017).
91. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **122**, 1360 (2018).
92. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **123**, 1370 (2019).
93. J. H. Van Vleck, *Phys. Rev.* **12**

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art

Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 5 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
10 Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 15 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
20 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
25 Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

Den Erfindern gelang es, das neue, für das CitA-Protein kodierende citA-Gen von C. glutamicum, welches eine Sensor Kinase eines Zwei-Komponenten Systems ist, zu isolieren.

- 30 Zur Isolierung des citA-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten

Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:

- 5 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 10 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. 15 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

- Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli 20 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm 25 DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

- Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren 30 klonierten langen DNA-Fragmente können anschliessend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of

000169 BT / 77

Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das citA-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des citA-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der

Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

5 Schliesslich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

10 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-
15 260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70 % identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der
20 Hybridisierung einschliesslich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten
25 durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996). Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70 %
30 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's
35 Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,

000169 BT /

Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können

5 Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70 % oder mindestens 80 % oder mindestens 90 % bis 95 % Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy

10 Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide: a

15 Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, dass coryneforme Bakterien nach

20 Abschwächung des citA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des citA-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder

25 ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Massnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

30 Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy

000169 BT /

(Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),
5 Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die
15 Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen
20 Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine
25 Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die
30 Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in
35 deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die

"000169 BT / TP"

Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren
Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen
Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung
derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und
5 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker ("Gene und
Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,
10 1990) oder dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu
mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology
9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung
15 (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene
replacement).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler
Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen
Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise
20 *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als
Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al.,
Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob
(Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder
pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174:
25 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI,
USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological
Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt
(Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,
Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder
30 pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology
173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das
zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird
anschliessend durch Konjugation oder Transformation in den
gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode
35 der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.

000169 BT /

(Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))
beschrieben. Methoden zur Transformation sind
beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology
and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivanan
5 (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS
Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.
Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-
Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens
durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei
10 unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-
Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von
Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology
42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C.
glutamicum verwendet.

15 Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird
eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder
Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro
hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen
für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und
20 dieser anschliessend durch Transformation oder Konjugation
in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach
homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration
bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten
zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses
25 im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau
der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde
beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144,
915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C.
glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

30 In das citA-Gen kann auf diese Weise eine Deletion,
Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur
Abschwächung des citA-Gens eines oder mehrere Enzyme des
35 jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der

000169 BT / TP

Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222)
- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388), oder

- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
(DE: 199 59 328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

5 Ausserdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des citA-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- 10 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
(DE:1995 1975.7, DSM 13114)
- 15 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
(DE: 199 59 327.2, DSM 13113)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des citA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing
20 Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäss hergestellten Mikroorganismen sind
25 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere
30 L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über

bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen.

Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener

10 Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als

Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse,

15 Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure
20 verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
25 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

30 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

35 Schliesslich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren

000169 BT / 16

und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschliessender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung einer Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin,

- L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine oder mehrere der genannten
- 5 Aminosäuren produzieren.

Folgender Mikroorganismus wurde am 23.01.2001 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 10 • Escherichia coli Stamm Top10/pCR2.1citAint als DSM 13998.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.
- 15
- 20

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

000169 BT /IP

BeispieleBeispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
C. glutamicum ATCC 13032

- 5 Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei
Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham
Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die
10 DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase
(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of
15 Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
20 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.

- Anschliessend wurde die Cosmid-DNA mit dem
Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-
25 04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA
wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der
Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-
0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde
30 anschliessend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts
(Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II
XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

000169 BT /

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens citA

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Grössenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das

DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschliessend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschliessend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1653 bp, welches als citA-Gen bezeichnet wurde. Das citA-Gen kodiert für ein Polypeptid von von 551 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des citA-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des citA-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 4 und SEQ ID No. 5):

citA-int1:
5' TTC CAG TCG GTG AGG TCA GT 3'
citA-int2:
5' GTA CGA TCG CGG ATG GTT AC 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase, Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines 480 bp großen internen Fragmentes des citA-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das amplifizierte DNA-Fragment (siehe SEQ ID No. 3) wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in

den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10 mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1citAint genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 23.01.2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Top10/pCR2.1citAint als DSM 13998

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des citA-Gens in den Stämmen DSM 5715 und FERM-BP 1763

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1citAint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in die Stämme Corynebacterium glutamicum DSM 5715 und Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten (EP-B-0435132), bei dem Stamm FERM-BP 1763 um einen Mycophenolsäure-resistenten Valin-Produzenten (US-A-

5,188,948). Der Vektor pCR2.1citAint kann in DSM5715 und FERM-BP 1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM-BP 1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1citAint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das citAint-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA je eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI, BamHI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1citAint hatte innerhalb des chromosomalen citA-Gens ins Chromosom von DSM5715 und ins Chromosom von FERM-BP 1763 inseriert. Die Stämme wurden als DSM5715::pCR2.1citAint und FERM-BP 1763::pCR2.1citAint bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C.glutamicum Stamm DSM5715::pCR2.1citAint wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wird auf pH 7.4 eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD beträgt. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

Salze:

(NH₄)₂SO₄ 25 g/l

KH₂PO₄ 0,1 g/l

| | |
|--|----------|
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 1,0 g/l |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 10 mg/l |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 10 mg/l |
| MnSO ₄ * H ₂ O | 5,0mg/l |
| Biotin (sterilfiltriert) | 0,3 mg/l |
| Thiamin * HCl (sterilfiltriert) | 0,2 mg/l |
| Leucin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| CaCO ₃ | 25 g/l |

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt.

- 5 Die Kultivierung erfolgte in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

- 10 Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion
- 15 bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

000169 BT /

Tabelle 1

| Stamm | OD(660) | Lysin-HCl g/l |
|------------------------|---------|------------------|
| DSM5715 | 7,5 | 13,3 |
| DSM5715::pCR2.1citAint | 7,4 | 14,4 |

Beispiel 6

Herstellung von Valin

- 5 Der in Beispiel 4 erhaltene *B. lactofermentum* Stamm FERM-BP 1763::pCR2.1citAint wurde in einem zur Produktion von Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- 10 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem
- 15 wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

20 Medium MM

| | |
|------------------------------------|--------|
| CSL (Corn Steep Liquor) | 5 g/l |
| MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) | 20 g/l |
| Glucose (getrennt autoklaviert) | 50g/l |

Salze:

| | |
|---|----------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 25 g/l |
| KH_2PO_4 | 0,1 g/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 1,0 g/l |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 10 mg/l |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 10 mg/l |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 5,0mg/l |
| Isoleucin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| Methionin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| Thiamin * HCl (sterilfiltriert) | 0,2 mg/l |
| Leucin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| CaCO_3 | 25 g/l |

CSL (Corn Steep Liquor), MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgte in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

- 10 Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie

und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

5

Tabelle 2

| Stamm | OD(660) | Valin-HCl g/l |
|--------------------------------|---------|------------------|
| FERM-BP 1763 | 12,1 | 7,5 |
| FERM-BP 1763::pCR2.1citAint | 13,5 | 10,8 |

p. 000169 BT IP

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das citA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000169 BT

<140>

10 <141>

<160> 5

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2055

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (201)..(1853)

<223> citA-Gen

25

<400> 1

tttctgtgtt tctcgaaact ttgagatccc gagtggtctg tggtgcttgt gggaggtataa 60
 ggtggcgcggt gtcacgcaca gaagtgtttg gtgcattgcc tgaggtagtg cgcaaaataa 120
 gactttttgtg cattatgatc agaattgttg gcttgggact tcgcttcacg ctctgctgat 180
 aatcgccccc gggggtagac atg tct gtt ggt gga tcc gac tgg aaa aac ttc 233
 Met Ser Val Gly Gly Ser Asp Trp Lys Asn Phe
 1 5 10

35

aag gag gtg gac atc att cgc ttt gct acc cga ata ctg gtg att caa 281
 Lys Glu Val Asp Ile Ile Arg Phe Ala Thr Arg Ile Leu Val Ile Gln
 15 20 25

40

gtg gct acc gtc gcg ttg gtg gta gct att tgc acc gga att ttc gca 329
 Val Ala Thr Val Ala Leu Val Val Ala Ile Cys Thr Gly Ile Phe Ala
 30 35 40

45

gtt ttg atg atg gat cag atg aaa act gag gcc gag cac aca gcg ctg 377
 Val Leu Met Met Asp Gln Met Lys Thr Glu Ala Glu His Thr Ala Leu
 45 50 55

50

tcc atc gga cgt tcg gtg gca tcc aac ccg cag atc cgc gag gaa gta 425
 Ser Ile Gly Arg Ser Val Ala Ser Asn Pro Gln Ile Arg Glu Glu Val
 60 65 70 75

55

gcg ctt gat act caa aca gga gca aac cca tcg gcc gaa gaa tta gcc 473
 Ala Leu Asp Thr Gln Thr Gly Ala Asn Pro Ser Ala Glu Glu Leu Ala
 80 85 90

gat gga gat atc caa gcg gtt gca cag gcg gcc aat gaa cgc act gga 521
 Asp Gly Asp Ile Gln Ala Val Ala Gln Ala Ala Asn Glu Arg Thr Gly
 95 100 105

000169 BT IP

5 gct ttg ttt gtc gtt atc act gac ggt tta ggt atc cgc ctg tcc cac 569
 Ala Leu Phe Val Val Ile Thr Asp Gly Leu Gly Ile Arg Leu Ser His
 110 115 120

cca gat gag gaa cgt ctg ggg gag cag gtg agc act agc ttt gag gct 617
 Pro Asp Glu Glu Arg Leu Gly Glu Gln Val Ser Thr Ser Phe Glu Ala
 125 130 135

10 gcc atg cgg ggt gaa gaa acc atg gcg tgg gag act ggg acc ctc ggt 665
 Ala Met Arg Gly Glu Glu Thr Met Ala Trp Glu Thr Gly Thr Leu Gly
 140 145 150 155

15 gcg tcc gcg cga gca aaa gtg cct atc ttt gcg ccg gat tct agt gtt 713
 Ala Ser Ala Arg Ala Lys Val Pro Ile Phe Ala Pro Asp Ser Ser Val
 160 165 170

20 cca gtc ggt gag gtc agt gtt ggg ttt gag cga gac agt gtg tat tcc 761
 Pro Val Gly Glu Val Ser Val Gly Phe Glu Arg Asp Ser Val Tyr Ser
 175 180 185

25 cgc ctg ccc atg ttc ctc gcc gcc ctt gct ctt att tct gtg ttg gga 809
 Arg Leu Pro Met Phe Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ile Ser Val Leu Gly
 190 195 200

atc ctt atc ggc gtg ggt gta gcc atg ggc atg cga cgc cgt tgg gaa 857
 Ile Leu Ile Gly Val Gly Val Ala Met Gly Met Arg Arg Arg Trp Glu
 205 210 215

30 cgc gtg acc ttg ggt ttg cag ccg gag gag cta gtg acc ctt gtg caa 905
 Arg Val Thr Leu Gly Leu Gln Pro Glu Glu Leu Val Thr Leu Val Gln
 220 225 230 235

35 aat cag act gca gtc atc gat ggc att gat gag ggc gtg ctg gcg ctg 953
 Asn Gln Thr Ala Val Ile Asp Gly Ile Asp Glu Gly Val Leu Ala Leu
 240 245 250

40 agc cca aac gga aca att ggg gtg cat aat gag cag gcg caa tcc atg 1001
 Ser Pro Asn Gly Thr Ile Gly Val His Asn Glu Gln Ala Gln Ser Met
 255 260 265

45 att ggt gca ggt cct atg agt ggc agg acg ttg aaa gaa cta ggg ctt 1049
 Ile Gly Ala Gly Pro Met Ser Gly Arg Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu
 270 275 280

gac ctg ggt ctt gat ggc gtt gta ttg cat ggt cag cat ccg gaa acc 1097
 Asp Leu Gly Leu Asp Gly Val Val Leu His Gly Gln His Pro Glu Thr
 285 290 295

50 gtt gcc cat aac ggc agg atc ctc tat ctg gat ttc cac ccc gtg cgc 1145
 Val Ala His Asn Gly Arg Ile Leu Tyr Leu Asp Phe His Pro Val Arg
 300 305 310 315

55 cgt ggg gat caa gat tta ggc tac gtg gta acc atc cgc gat cgt acc 1193
 Arg Gly Asp Gln Asp Leu Gly Tyr Val Val Thr Ile Arg Asp Arg Thr
 320 325 330

gac atc att gaa ctc agt gaa cgc ctc gac tct gtg cgc acc atg acc 1241
 Asp Ile Ile Glu Leu Ser Glu Arg Leu Asp Ser Val Arg Thr Met Thr

000169 BT /
 31

| | 335 | 340 | 345 | |
|----|---|---|-----------------------------------|----------------------|
| 5 | cac gca ctc cgc gcc cag cgc His Ala Leu Arg Ala Gln Arg 350 | cac gag ttt gcc aac cgc His Glu Phe Ala Asn Arg 355 | atc cac acc Ile His Thr 360 | 1289 |
| 10 | gca aca ggg ctt atc gac gcc ggc cgc gtc cac gac gcg gca gag ttt Ala Thr Gly Leu Ile Asp Ala Gly Arg Val His Asp Ala Ala Glu Phe 365 | 370 | 375 | 1337 |
| 15 | cta ggc gat ata tcc cgc aac ggg gga cag tca cat cca ttg atc gga Leu Gly Asp Ile Ser Arg Asn Gly Gly Gln Ser His Pro Leu Ile Gly 380 | 385 | 390 | 1385 |
| 20 | tca gcg cac ctc aat gaa gca ttt ttg agc tca ttt tta agt act gct Ser Ala His Leu Asn Glu Ala Phe Leu Ser Ser Phe Leu Ser Thr Ala 400 | 405 | 410 | 1433 |
| 25 | tct att tcg gca tct gaa aag ggc gtt agt ctg cgc atc aac tct gac Ser Ile Ser Ala Ser Glu Lys Gly Val Ser Leu Arg Ile Asn Ser Asp 415 | 420 | 425 | 1481 |
| 30 | acg ctc atc ctt ggc act gtt aaa gat cca gaa gat gta gca acc att Thr Leu Ile Leu Gly Thr Val Lys Asp Pro Glu Asp Val Ala Thr Ile 430 | 435 | 440 | 1529 |
| 35 | ttg ggt aat tta atc aac aat gcc atc gac gcc gcg gtg gca ggt gaa Leu Gly Asn Leu Ile Asn Asn Ala Ile Asp Ala Ala Val Ala Gly Glu 445 | 450 | 455 | 1577 |
| 40 | gcc cca cgg tgg att gag ctt acg ttg atg gat gat gcc gat acg ctg Ala Pro Arg Trp Ile Glu Leu Thr Leu Met Asp Asp Ala Asp Thr Leu 460 | 465 | 470 | 1625 |
| 45 | gtc att tct gtt gca gat tct ggt cct gga atc cca gag ggc gtg gat Val Ile Ser Val Ala Asp Ser Gly Pro Gly Ile Pro Glu Gly Val Asp 480 | 485 | 490 | 1673 |
| 50 | gta ttt gcc aca gcc acc cag ata gga gac tct gaa gat aat gaa cgc Val Phe Ala Thr Ala Thr Gln Ile Gly Asp Ser Glu Asp Asn Glu Arg 495 | 500 | 505 | 1721 |
| 55 | acc cac ggg cat ggc att ggt cta aaa ctg tgc cgg gct ttg gct aga Thr His Gly His Gly Ile Gly Leu Lys Leu Cys Arg Ala Leu Ala Arg 510 | 515 | 520 | 1769 |
| 60 | tca cat ggt ggc gat gtc tgg gtg att gat aga gga acc gaa gat ggc Ser His Gly Gly Asp Val Trp Val Ile Asp Arg Gly Thr Glu Asp Gly 525 | 530 | 535 | 1817 |
| 65 | gct gta ttt gga gtg aaa cta ccg gga gta atg gag taatggatca Ala Val Phe Gly Val Lys Leu Pro Gly Val Met Glu 540 | 545 | 550 | 1863 |
| 70 | aacacttaaa gttttagtaa ttgatgatga tttccgcgtc gccggcattc acgcctccat cgttgatgcg tcccctggat tttcgggtggt cgggtaccgcg cgtaccctcg cagaggcaaa aaccctgatc gccacatttt ccccggatct cctacttggt gatgtctacc tccccgacgg | | | 1923 1983 2043 |

000169 BT / 32

cgatggcatt ga

2055

5 <210> 2
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

10 <400> 2
 Met Ser Val Gly Gly Ser Asp Trp Lys Asn Phe Lys Glu Val Asp Ile
 1 5 10 15

15 Ile Arg Phe Ala Thr Arg Ile Leu Val Ile Gln Val Ala Thr Val Ala
 20 25 30

Leu Val Val Ala Ile Cys Thr Gly Ile Phe Ala Val Leu Met Met Asp
 35 40 45

20 Gln Met Lys Thr Glu Ala Glu His Thr Ala Leu Ser Ile Gly Arg Ser
 50 55 60

Val Ala Ser Asn Pro Gln Ile Arg Glu Glu Val Ala Leu Asp Thr Gln
 65 70 75 80

25 Thr Gly Ala Asn Pro Ser Ala Glu Glu Leu Ala Asp Gly Asp Ile Gln
 85 90 95

30 Ala Val Ala Gln Ala Ala Asn Glu Arg Thr Gly Ala Leu Phe Val Val
 100 105 110

Ile Thr Asp Gly Leu Gly Ile Arg Leu Ser His Pro Asp Glu Glu Arg
 115 120 125

35 Leu Gly Glu Gln Val Ser Thr Ser Phe Glu Ala Ala Met Arg Gly Glu
 130 135 140

Glu Thr Met Ala Trp Glu Thr Gly Thr Leu Gly Ala Ser Ala Arg Ala
 145 150 155 160

40 Lys Val Pro Ile Phe Ala Pro Asp Ser Ser Val Pro Val Gly Glu Val
 165 170 175

45 Ser Val Gly Phe Glu Arg Asp Ser Val Tyr Ser Arg Leu Pro Met Phe
 180 185 190

Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ile Ser Val Leu Gly Ile Leu Ile Gly Val
 195 200 205

50 Gly Val Ala Met Gly Met Arg Arg Arg Trp Glu Arg Val Thr Leu Gly
 210 215 220

Leu Gln Pro Glu Glu Leu Val Thr Leu Val Gln Asn Gln Thr Ala Val
 225 230 235 240

55 Ile Asp Gly Ile Asp Glu Gly Val Leu Ala Leu Ser Pro Asn Gly Thr
 245 250 255

Ile Gly Val His Asn Glu Gln Ala Gln Ser Met Ile Gly Ala Gly Pro

000169 BT /

260 265 270
 5 Met Ser Gly Arg Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu Asp Leu Gly Leu Asp
 275 280 285
 Gly Val Val Leu His Gly Gln His Pro Glu Thr Val Ala His Asn Gly
 290 295 300
 10 Arg Ile Leu Tyr Leu Asp Phe His Pro Val Arg Arg Gly Asp Gln Asp
 305 310 315 320
 Leu Gly Tyr Val Val Thr Ile Arg Asp Arg Thr Asp Ile Ile Glu Leu
 325 330 335
 15 Ser Glu Arg Leu Asp Ser Val Arg Thr Met Thr His Ala Leu Arg Ala
 340 345 350
 Gln Arg His Glu Phe Ala Asn Arg Ile His Thr Ala Thr Gly Leu Ile
 355 360 365
 20 Asp Ala Gly Arg Val His Asp Ala Ala Glu Phe Leu Gly Asp Ile Ser
 370 375 380
 25 Arg Asn Gly Gly Gln Ser His Pro Leu Ile Gly Ser Ala His Leu Asn
 385 390 395 400
 Glu Ala Phe Leu Ser Ser Phe Leu Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala Ser
 405 410 415
 30 Glu Lys Gly Val Ser Leu Arg Ile Asn Ser Asp Thr Leu Ile Leu Gly
 420 425 430
 Thr Val Lys Asp Pro Glu Asp Val Ala Thr Ile Leu Gly Asn Leu Ile
 435 440 445
 35 Asn Asn Ala Ile Asp Ala Ala Val Ala Gly Glu Ala Pro Arg Trp Ile
 450 455 460
 40 Glu Leu Thr Leu Met Asp Asp Ala Asp Thr Leu Val Ile Ser Val Ala
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Pro Gly Ile Pro Glu Gly Val Asp Val Phe Ala Thr Ala
 485 490 495
 45 Thr Gln Ile Gly Asp Ser Glu Asp Asn Glu Arg Thr His Gly His Gly
 500 505 510
 Ile Gly Leu Lys Leu Cys Arg Ala Leu Ala Arg Ser His Gly Gly Asp
 515 520 525
 50 Val Trp Val Ile Asp Arg Gly Thr Glu Asp Gly Ala Val Phe Gly Val
 530 535 540
 55 Lys Leu Pro Gly Val Met Glu
 545 550

<211> 481
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>
 <223> citAint

<400> 3
 10 ttccagtcgg tgaggtcagt gttggggttg agcgagacag tgtgtattcc cgcctgcca 60
 tgttcctcgc cgcccttgct cttatttctg tgttggaat ccttatcggc gtgggtgtag 120
 ccatgggcat gcgacgccgt tgggaacgcg tgaccttggg tttgcagccg gaggagctag 180
 tgaccttgt gcaaaatcag actgcagtca tcgatggcat tgatgagggc gtgctggcgc 240
 tgagccaaa cggaacaatt ggggtgcata atgagcaggc gcaatccatg attggtgcag 300
 15 gtcctatgag tggcaggacg ttgaaagaac tagggcttga cctgggtcct gatggcggtg 360
 tattgcatgg tcagcatccg gaaaccgttg cccataacgg caggatcctc tatctggatt 420
 tccaccccggt gcgccgtggg gatcaagatt taggctacgt ggtaaccatc cgcgatcgta 480
 c 481

20 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

25 <220>
 <223> Primer citA-int1

<400> 4
 30 ttccagtcgg tgaggtcagt 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> Primer citA-int2

40 <400> 5
 gtacgatcgc ggatgggttac 20

Folgende Figur ist beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1citAint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

| | |
|----------|---|
| KmR: | Kanamycin Resistenz-Gen |
| EcoRI: | Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI |
| HindIII: | Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII |
| BamHI: | Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI |
| citAint: | internes Fragment des citA-Gens |
| ColE1: | Replikationsursprung des Plasmides ColE1 |

5

10

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das citA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Sensor Kinase CitA aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäss Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäss Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäss Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.

5. Replizierbare DNA gemäss Anspruch 2 enthaltend
- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in
SEQ ID No. 1, oder
 - 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären
10 Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Verfahren gemäss Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass die Hybridisierung unter einer Stringenz
15 entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäss Anspruch 2, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Vektor pCR2.1citAint, der
- 20 8.1. ein 480 bp großes internes Fragment der citA-Gens
trägt, dargestellt in der SEQ ID. No. 3,
- 8.2 dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben
25 wird, und
- 8.3 der in dem E. coli-Stamm Top10/pCR2.1citAint
unter der Nr. DSM 13998 bei der Deutschen
Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
30 hinterlegt ist

TOP SECRET 030400000

9. Internes Fragment des citA-Gens mit einer Länge von 480 bp, dargestellt in der SEQ ID No. 3.
10. Coryneforme Bakterien, in denen das citA-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird, insbesondere durch Deletion.
11. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das citA-Gen abschwächt,
- b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
12. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
13. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
14. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das citA-Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.
15. Verfahren gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,

1. *Introduction*
 2. *Methodology*
 3. *Results*
 4. *Discussion*
 5. *Conclusion*
 6. *References*
 7. *Appendix*
 8. *Notes*
 9. *Tables*
 10. *Figures*
 11. *Supplementary Materials*
 12. *Correspondence*
 13. *Conflict of Interest*
 14. *Acknowledgments*
 15. *Author Contributions*
 16. *References*
 17. *Appendix*
 18. *Notes*
 19. *Tables*
 20. *Figures*
 21. *Supplementary Materials*
 22. *Correspondence*
 23. *Conflict of Interest*
 24. *Acknowledgments*
 25. *Author Contributions*
 26. *References*
 27. *Appendix*
 28. *Notes*
 29. *Tables*
 30. *Figures*
 31. *Supplementary Materials*
 32. *Correspondence*
 33. *Conflict of Interest*
 34. *Acknowledgments*
 35. *Author Contributions*
 36. *References*
 37. *Appendix*
 38. *Notes*
 39. *Tables*
 40. *Figures*
 41. *Supplementary Materials*
 42. *Correspondence*
 43. *Conflict of Interest*
 44. *Acknowledgments*
 45. *Author Contributions*
 46. *References*
 47. *Appendix*
 48. *Notes*
 49. *Tables*
 50. *Figures*
 51. *Supplementary Materials*
 52. *Correspondence*
 53. *Conflict of Interest*
 54. *Acknowledgments*
 55. *Author Contributions*
 56. *References*
 57. *Appendix*
 58. *Notes*
 59. *Tables*
 60. *Figures*
 61. *Supplementary Materials*
 62. *Correspondence*
 63. *Conflict of Interest*
 64. *Acknowledgments*
 65. *Author Contributions*
 66. *References*
 67. *Appendix*
 68. *Notes*
 69. *Tables*
 70. *Figures*
 71. *Supplementary Materials*
 72. *Correspondence*
 73. *Conflict of Interest*
 74. *Acknowledgments*
 75. *Author Contributions*
 76. *References*
 77. *Appendix*
 78. *Notes*
 79. *Tables*
 80. *Figures*
 81. *Supplementary Materials*
 82. *Correspondence*
 83. *Conflict of Interest*
 84. *Acknowledgments*
 85. *Author Contributions*
 86. *References*
 87. *Appendix*
 88. *Notes*
 89. *Tables*
 90. *Figures*
 91. *Supplementary Materials*
 92. *Correspondence*
 93. *Conflict of Interest*
 94. *Acknowledgments*
 95. *Author Contributions*
 96. *References*
 97. *Appendix*
 98. *Notes*
 99. *Tables*
 100. *Figures*
 101. *Supplementary Materials*
 102. *Correspondence*
 103. *Conflict of Interest*
 104. *Acknowledgments*
 105. *Author Contributions*
 106. *References*
 107. *Appendix*
 108. *Notes*
 109. *Tables*
 110. *Figures*
 111. *Supplementary Materials*
 112. *Correspondence*
 113. *Conflict of Interest*
 114. *Acknowledgments*
 115. *Author Contributions*
 116. *References*
 117. *Appendix*
 118. *Notes*
 119. *Tables*
 120. *Figures*
 121. *Supplementary Materials*
 122. *Correspondence*
 123. *Conflict of Interest*
 124. *Acknowledgments*
 125. *Author Contributions*
 126. *References*
 127. *Appendix*
 128. *Notes*
 129. *Tables*
 130. *Figures*
 131. *Supplementary Materials*
 132. *Correspondence*
 133. *Conflict of Interest*
 134. *Acknowledgments*
 135. *Author Contributions*
 136. *References*
 137. *Appendix*
 138. *Notes*
 139. *Tables*
 140. *Figures*
 141. *Supplementary Materials*
 142. *Correspondence*
 143. *Conflict of Interest*
 144. *Acknowledgments*
 145. *Author Contributions*
 146. *References*
 147. *Appendix*
 148. *Notes*
 149. *Tables*
 150. *Figures*
 151. *Supplementary Materials*
 152. *Correspondence*
 153. *Conflict of Interest*
 154. *Acknowledgments*
 155. *Author Contributions*
 156. *References*
 157. *Appendix*
 158. *Notes*
 159. *Tables*
 160. *Figures*
 161. *Supplementary Materials*
 162. *Correspondence*
 163. *Conflict of Interest*
 164. *Acknowledgments*
 165. *Author Contributions*
 166. *References*
 167. *Appendix*
 168. *Notes*
 169. *Tables*
 170. *Figures*
 171. *Supplementary Materials*
 172. *Correspondence*
 173. *Conflict of Interest*
 174. *Acknowledgments*
 175. *Author Contributions*
 176. *References*
 177. *Appendix*
 178. *Notes*
 179. *Tables*
 180. *Figures*
 181. *Supplementary Materials*
 182. *Correspondence*
 183. *Conflict of Interest*
 184. *Acknowledgments*
 185. *Author Contributions*
 186. *References*
 187. *Appendix*
 188. *Notes*
 189. *Tables*
 190. *Figures*
 191. *Supplementary Materials*
 192. *Correspondence*
 193. *Conflict of Interest*
 194. *Acknowledgments*
 195. *Author Contributions*
 196. *References*
 197. *Appendix*
 198. *Notes*
 199. *Tables*
 200. *Figures*
 201. *Supplementary Materials*
 202. *Correspondence*
 203. *Conflict of Interest*
 204. *Acknowledgments*
 205. *Author Contributions*
 206. *References*
 207. *Appendix*
 208. *Notes*
 209. *Tables*
 210. *Figures*
 211. *Supplementary Materials*
 212. *Correspondence*
 213. *Conflict of Interest*
 214. *Acknowledgments*
 215. *Author Contributions*
 216. *References*
 217. *Appendix*
 218. *Notes*
 219. *Tables*
 220. *Figures*
 221. *Supplementary Materials*
 222. *Correspondence*
 223. *Conflict of Interest*
 224. *Acknowledgments*
 225. *Author Contributions*
 226. *References*
 227. *Appendix*
 228. *Notes*
 229. *Tables*
 230. *Figures*
 231. *Supplementary Materials*
 232. *Correspondence*
 233. *Conflict of Interest*
 234. *Acknowledgments*
 235. *Author Contributions*
 236. *References*
 237. *Appendix*
 238. *Notes*
 239. *Tables*
 240. *Figures*
 241. *Supplementary Materials*
 242. *Correspondence*
 243. *Conflict of Interest*
 244. *Acknowledgments*
 245. *Author Contributions*
 246. *References*

16. Verfahren gemäss Anspruch 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen
man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 16.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap
- 16.3 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 16.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 16.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 16.6 das für eine feed back resistente Aspartatkinase
kodierende Gen lysC,
- 16.7 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
17. Verfahren gemäss Anspruch 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe:
- 17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,

17.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen *pgi*,

17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*

17.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*

5 abschwächt.

18. Verfahren gemäss einem oder mehreren der
vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*
10 einsetzt.

19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder
Gene zu isolieren, die für Sensor Kinase *CitA* kodieren
oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *citA*-
15 Gens aufweisen,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man die Polynukleotide, die die Sequenzen gemäss
den Ansprüchen 1 bis 4 enthalten, als
Hybridisierungssonden einsetzt.

000169 BT /

Neue für das citA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
20 Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das citA-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemässen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.